

高产纳豆激酶突变菌株产酶条件的研究

李文亮,边鸣镝,王海波

(吉林大学 农学部军需科技学院, 吉林 长春 130062)

摘要:为了获得最佳产酶条件,通过研究不同碳源(葡萄糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉),氮源(牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏、硫酸铵),碳氮浓度比和无机离子组成的培养基发酵,利用纤维蛋白平板法测定纳豆激酶的活性。得到纳豆激酶的最佳产酶条件为:1.5%蛋白胨,1.5%麦芽糖,0.05%硫酸镁,0.2%氯化钙,0.2%磷酸二氢钠和0.1%磷酸氢二钠;碳氮浓度比为1:1。

关键词:纳豆;纳豆激酶;纤维蛋白平板法;条件优化

中图分类号:TQ464.8

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0692-04

Optimization on Fermentation Conditions of a High-yield Nattokinase Mutant

LI Wen-liang, BIAN Ming-di, WANG Hai-bo

(College of Quartermaster Technology, Department of Agronomy, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: In order to obtain optimal conditions for nattokinase production, the influencing factors of carbon source (glucose, sucrose), nitrogen source (beef extract, peptone, soy peptone, yeast extract, ammonia sulfate), C/N concentration and inorganic ions composition were investigated by fermentation culture and the activity of nattokinase was determined by fibrin plate method. Results showed that the best condition of enzyme production was 1.5% peptone, 1.5% maltose, 0.05% MgSO_4 , 0.2% CaCl_2 , 0.2% NaH_2PO_4 and 0.1% Na_2HPO_4 , with the carbon and nitrogen concentration ratio of 1:1.

Key words: Natto; Nattokinase; Fibrin plate; Conditions optimization

纳豆激酶(nattokinase)作为一种高效溶血栓蛋白具有很强的体内外溶栓作用,并具口服吸收溶栓的优点,是具有开发潜力的食源性溶栓药物。目前,许多研究者在纳豆激酶的研究与开发方面虽然做了一定的工作,但仍不能满足纳豆激酶生产和应用的要求。该文研究并优化了高产纳豆激酶突变菌株产酶条件,旨在进一步为纳豆激酶的生产 and 应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株:由实验室分离所得,鉴定其为试验条件下的高产突变菌株。培养基^[1-4](采用121℃灭菌20 min)。氮源:牛肉膏,蛋白胨,大豆蛋白胨,酵母膏,硫酸铵。碳源:葡萄糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉等。

1.2 仪器与设备

离心机、天平,水平层流双人净化工作台, HPS-250生化培养箱,磁力搅拌器, BS110S型电子分析天平,恒温摇床,恒温水浴锅等。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的确定 纤维蛋白平板的制备:将纤维蛋白原溶于pH7.4磷酸盐缓冲液中,制成 $0.89\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可凝结蛋白溶液,凝血酶溶于pH7.4磷酸盐缓冲液中,制成 $7.5\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。取纤维蛋白原15 mL,凝血酶1 mL,琼脂糖溶液(0.5%)20 mL在水浴50℃恒温15 min,然后充分混合,倒入圆形平皿中冷却,制成琼脂糖—纤维蛋白平板。将发酵液离心取上清液,经适当稀释,作为粗酶液。在琼脂糖—纤维蛋白平板上打孔,然后用微量移液枪滴10 μL 粗酶液于孔内,放入37℃恒温箱培养18 h^[5]。

标准曲线的绘制:参照杨郁等的方法^[6]。

样品纳豆激酶活力的测定:取经过适当稀释的样品10 μL 在纤维蛋白平板上点样,每个浓度各点3次,在37℃恒温培养18 h后测定溶圈2个互相垂直的直径大小,计算溶圈面积,反复测量3次,求得平均值,查纳豆激酶活性标准曲线,即可测得样品的酶活^[7]。

1.3.2 产酶条件的优化 分别采用牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏和硫酸铵5种氮源,其它条

件相同,发酵培养后分别测定纳豆激酶酶活性,考察不同氮源对产酶的影响。同理,分别用葡萄糖、木糖、麦芽糖、蔗糖和淀粉 5 种碳源考察不同碳源对纳豆激酶产酶的影响^[8-10]。以 2 因素 6 水平完全随机设计,比较碳源、氮源的浓度分别在 0.5%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 时对纳豆激酶发酵产酶的影响。然后设计 4 因素 3 水平的正交试验,考察硫酸镁、氯化钙、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠等离子组成对产酶的影响。

2 结果与分析

2.1 纳豆激酶酶活测定

用游标卡尺测量溶圈 2 个互相垂直的直径,计算溶圈面积,反复测量 3 次,求得平均值,并绘制酶活标准曲线,以溶圈面积为横坐标,以标准尿激酶活性为纵坐标作标准曲线。

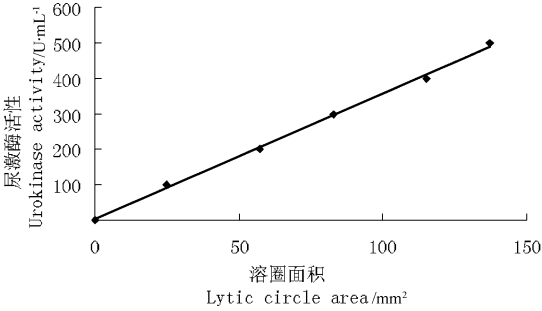


图 1 尿激酶活性标准曲线

Fig. 1 standard curve of urokinase activity

由图 1 可知,此标准曲线可供测定纳豆激酶的活性使用,其线性关系为 $y = 3.063x + 62.33$,相关系数为 0.993。

2.2 产酶条件的优化

2.2.1 不同氮源对产酶的影响 分别以浓度均为 2% 的牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏和硫酸铵为氮源,研究了不同氮源对纳豆激酶活性的影响。

表 1 不同氮源对产酶的影响

Table 1 Effect of nitrogen source on Nattokinase production

| | 牛肉膏 Beef extract | 蛋白胨 Peptone | 大豆蛋白胨 Soy peptone | 酵母膏 Yeast extract | 硫酸铵 Ammonia sulfate |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| 纳豆激酶活性 Nattokinase activity/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 467.966 | 767.929 | 739.400 | 358.323 | 122.279 |
| 溶圈面积 Lytic circle area/ mm^2 | 132.431 | 230.362 | 221.048 | 96.635 | 19.572 |

由表 1 可知,蛋白胨和大豆蛋白胨作为氮源时,其酶活都远远高于其它氮源,且蛋白胨稍高于大豆蛋白胨,达到 $767.929 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这可能是由于蛋白胨和大豆蛋白胨都属于复合型培养基,它们除了含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸外,还含有少量的糖类、脂肪、无机盐、维生素及某些生长因子。因此与其它氮源相比,蛋白胨和大豆蛋白

胨能更快地被分解利用,因此产酶速度较快,产酶量也较大。结合原料成本和酶活等因素最后选择蛋白胨作为最适氮源。

2.2.2 不同碳源对产酶的影响 选择 2% 的葡萄糖、木糖、麦芽糖、蔗糖和淀粉为碳源,以 2% 蛋白胨为氮源研究了不同碳源对产酶的影响。

表 2 不同碳源对产酶的影响

Table 2 Effect of carbon source on Nattokinase production

| | 葡萄糖 Glucose | 木糖 Xylose | 麦芽糖 Maltose | 蔗糖 Sucrose | 淀粉 Starch |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|--------------|----------------|---------------|--------------|
| 纳豆激酶活性 Nattokinase activity/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 600.980 | 581.763 | 710.430 | 617.888 | 532.779 |
| 溶圈面积 Lytic circle area/ mm^2 | 175.857 | 169.583 | 211.590 | 181.377 | 153.591 |

由表 2 可知,葡萄糖、木糖、麦芽糖、蔗糖和淀粉均有利于菌种的发酵,产酶量都较高,平均酶活为 $608.768 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。5 种碳源中,多糖淀粉的产酶量最低,单糖葡萄糖和木糖的产酶量均较接近平均值,双糖蔗糖和麦芽糖产酶量较高,而以麦芽糖作为碳源时,纳豆激酶产酶量达到最高的 $710.430 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,且麦芽糖原料来源和价格也适宜,因此选

取麦芽糖作为培养基的最适碳源。

2.2.3 碳氮浓度及比例对产酶的影响 为了确定试验的碳源、氮源浓度和碳氮浓度比,选用麦芽糖作为碳源,蛋白胨作为氮源,碳源、氮源浓度各设置 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 6 个水平的完全随机设计。不同碳氮浓度对产酶的影响如表 3 所示。

表 3 不同碳源、氮源的不同浓度对产酶的影响

Tab. 3 different carbon and nitrogen sources of different concentrations on the production of enzymes

| A | | B 麦芽糖 Maltose/% | | | | | |
|----------------|-----|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 蛋白胨 | | B ₁ | B ₂ | B ₃ | B ₄ | B ₅ | B ₆ |
| Peptone/% | | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 |
| A ₁ | 0.5 | 306.029 | 328.592 | 418.985 | 450.536 | 410.718 | 360.520 |
| A ₂ | 1.0 | 338.713 | 383.136 | 487.531 | 432.703 | 416.270 | 405.124 |
| A ₃ | 1.5 | 370.980 | 491.942 | 528.021 | 561.744 | 495.037 | 435.493 |
| A ₄ | 2.0 | 379.133 | 421.159 | 495.129 | 442.962 | 466.631 | 430.352 |
| A ₅ | 2.5 | 418.172 | 384.836 | 430.648 | 439.986 | 386.635 | 363.431 |
| A ₆ | 3.0 | 373.220 | 369.871 | 428.577 | 419.673 | 393.287 | 375.209 |

对表 3 试验数据进行方差分析(表 4),A 因素、B 因素的 F 值均大于 $\alpha = 0.05$ 时的显著性临界值,

表 4 方差分析表

Table 4 Analysis test of variance

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方 | F | $\alpha = 0.05$ |
|--------|-------------|-----|------------|----------|-----------------|
| Source | SS | df | MS | | |
| A | 40358.91185 | 5 | 8071.78237 | 9.754782 | 3.86 |
| B | 46501.288 | 5 | 9300.2576 | 11.2394 | 3.86 |
| 误差 | 20686.73105 | 25 | 827.469242 | | |
| 总和 | 107546.9309 | 35 | 18199.5092 | | |
| Error | | | | | |
| Total | | | | | |

可知 A 因素、B 因素都达到 5% 显著性水平。

依据 SSR 值,对 A 因素、B 因素各水平的平均数进行 SSR 检验,结果可知,A₃ 为最佳氮源水平,B₃ 为最佳碳源水平。所以培养基最后选用 1.5% 蛋白胨为氮源,1.5% 麦芽糖为碳源,碳氮浓度比为 1:1。

2.2.4 无机离子对产酶的影响 在比较培养基离子组成时,选择了硫酸镁、氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,设 3 个水平设计正交试验比较各种离子对产酶的影响。

表 5 正交试验结果

Table 5 The result of orthogonal experiment design

| 因素 | A | B | C | 酶活 |
|-----------------------------|----------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 试验号 | MgSO ₄ | CaCl ₂ | Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ | Nattokinase activity/U · mL ⁻¹ |
| K ₁ | 823.558 | 1400.838 | 1111.902 | |
| K ₂ | 1506.729 | 1320.57 | 1360.394 | |
| K ₃ | 1331.639 | 940.518 | 1189.63 | |
| k ₁ | 274.5193 | 466.946 | 370.634 | |
| k ₂ | 502.243 | 440.19 | 453.4647 | |
| k ₃ | 443.8797 | 313.506 | 396.5433 | |
| R _j | 227.7237 | 153.44 | 82.83067 | |
| R _j ² | 51858.07 | 23543.83 | 6860.919 | Se 136.1306 |
| S _j | 29170.16 | 13243.41 | 3859.267 | fe 1 |
| F _j | 107.1404 | 48.64228 | 14.17487 | |
| α_j | <0.01 | 0.01 | 0.01 | |
| 优水平 | A ₂ | B ₁ | C ₂ | |
| 主次因素 | A,B,C, | | | |
| 最优组合 | A ₂ B ₁ C ₂ | | | |

表 6 正交试验结果方差分析

Table 6 Analysis of variance of extraction orthogonal test result

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方和 | F 值 | 显著性 |
|--------------------|---------------|---------|-------------|---------|------------------|
| Origin of variance | Sum of square | Freedom | Mean square | F value | Prominence level |
| A | 29170.16 | 2 | 14585.08 | 107.14 | $P < 0.01^{**}$ |
| B | 13243.41 | 2 | 6621.703 | 48.64 | 0.01 |
| C | 3859.267 | 2 | 1929.634 | 14.17 | 0.05 |

从表 5、6 可以看出,3 种因素中,硫酸镁对产酶条件的影响达到了显著性水平,而氯化钙和磷酸氢二钠/磷酸二氢钠对产酶条件的影响相对较小。通过 SSR 检验,只有 A_2 和 A_1 、 B_1 和 B_3 、 B_2 和 B_3 、 C_2 和 C_1 在 $\alpha=0.05$ 水平显著,其余皆不显著。

结果表明,培养基的无机离子组成宜选择 0.05% 硫酸镁,0.2% 氯化钙,0.2% 磷酸二氢钠和 0.1% 磷酸氢二钠。

3 结论

对影响纳豆激酶活性的碳源、氮源、碳氮浓度比和无机离子组成等产酶条件进行了优化,结果表明纳豆激酶的最佳产酶条件为:1.5% 蛋白胨,1.5% 麦芽糖,0.05% 硫酸镁,0.2% 氯化钙,0.2% 磷酸二氢钠和 0.1% 磷酸氢二钠,碳氮浓度比为 1:1。

参考文献

- [1] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [2] Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarandian S, et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8170-8174.
- [3] 陈启和,何国庆. 纳豆激酶的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 55-58. (Chen Q H, He Guo Q. Review of Nattokinase research[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(12): 55-58.)
- [4] 朱健辉,杜连祥,路福平,等. 高产纳豆激酶液态发酵工艺的优化[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 20-24. (Zhu J H, Du L X, Lu F P, et al. Optimization of fermentation conditions for high-production nattokinase[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(1): 20-24.)
- [5] 熊晓辉,李睿,陆利霞,等. 纳豆激酶的分离纯化及其特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 122-125. (Xiong X H, Li R, Lu L X, et al. Study on the purification of Nattokinase from the liquid fermentation and its characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(1): 122-125.)
- [6] 杨郁,张丽靖,天知诚吾. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2007, 23(10): 22-25. (Yang Y, Zhang L J, Seigo Amachi. Selection of high Nattokinase-producing strains and optimization of the fermentation conditions[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(10): 22-25.)
- [7] 方祥,周焕彩,王忠霞,等. 纳豆菌分离、鉴定及纳豆激酶高产菌株的正向选育[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 26-29. (Fang X, Zhou H C, Wang Z X, et al. Isolation and forward breeding of *Bacillus subtilis* Natto with high fibrinolytic activity Nattokinase[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(12): 26-29.)
- [8] 黄薇,孔繁东,祖国仁,等. 高 NK 活性纳豆菌的诱变选育及产酶条件的研究[J]. 食品科技, 2007(4): 17-21. (Huang W, Kong F D, Zu G R, et al. High NK activity of *Bacillus natto* by mutation breeding and study on culture conditions of nattokinase production[J]. Food Science and Technology, 2007(4): 17-21.)
- [9] 余功保,郭爱玲,秦巧玲,等. 一株高产纳豆激酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 227-231. (Yu G B, Guo A L, Qin Q L, et al. Screening of high Nattokinase activity producing strain and optimization of fermentation conditions[J]. Food Science, 2007, 28(4): 227-231.)
- [10] 张谦,陈大钧,熊颖,等. 纳豆激酶液体发酵条件的研究[J]. 四川食品与发酵, 2007(5): 42-46. (Zhang Q, Chen D J, Xiong Y, et al. Study on the liquid fermentation of Nattokinase[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2007(5): 42-46.)

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊。

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,128 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行,邮发代号:82-643。国内刊号 CN11-4996/S,国际统一刊号 ISSN1672-1810。

编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮编:100081 电话:010-82105794 010-82105796(兼传真)

网址:www.zwyczy.cn

E-mail:zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com